FLUORESZENZ-CYTOPHOTOMETRISCHE MESSUNG DES FEULGEN - DNS - GEHALTES INDIVIDUELLER CHROMOSOMEN DES WEIBLICHEN KARYOTYPS BEIM MENSCHEN

D I E T E R G R E I P L
AUS
LANDSHUT

1972

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

Fluoreszenz-cytophotometrische Messung des Feulgen-DNS - Gehaltes individueller Chromosomen des weiblichen Karyotyps beim Menschen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Dieter Greipl

aus

Landshut

1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. J.-D. M u r k e n

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. S p i e s s

Dekan: Prof. Dr. W. S p a n n

Tag der mündl.Prüfung: 19.12.1972

UNIV. LEIDEN BIB.

Inhaltsübersicht

I. Einleitung

II. Literaturübersicht

III. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Methodik der Chromosomen-Präparation

3.1.2. Kriterien der Mitose-Auswahl

3.1.3. Färbung der Chromosomen

3.2. Mess-Instrument und Mess-Vorgang

3.2.1. Die Auflicht-Mikroskopie

3.2.2. Einstellung des Objektes

3.2.3. Das Anregungslicht

3.2.4. Das Fluoreszenz-Licht

3.2.5. Angleichung der Blenden

3.2.6. Eichung der Photokathode

3.3. Ergebnis

3.3.1. Pararosanilin als Fluorochrom

3.3.2. Proportionalität zwischen Fluoreszenz-Intensität und Konzentration des Fluorochroms

3.3.3. Ausschliessung subjektiver Fehlerquellen

3.3.4. Messergebnisse

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0080

IV. Diskussion

4.1. Die Feulgen - Reaktion

4.2. Konzentration des Fluorochroms

4.3. Die Methodik

4.4. Der Messvorgang

4.5. Reabsorption

4.6. Bisherige fluorometrische DNS-Messungen

4.7. Prüfung der eigenen Ergebnisse

4.8. Genauigkeit der mikrofluorometrischen DNS-Messung

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Zur Identifizierung von Chromosomen und zur Feststellung von Materialverlusten sowie Materialverdoppelungen einzelner Chromosomen ist die Kenntnis des DNS-Gehaltes individueller Chromosomen von Bedeutung bei vergleichenden Untersuchungen von Chromosomen verschiedener Spezies oder entsprechenden Chromosomen gleicher Spezies.

Die Bestimmung des DNS-Gehaltes von Chromosomen erweist sich den herkömmlichen morphologischen (Bestimmung von Länge der Chromosomen, Centromer - Position, Satelliten) und autoradiographischen Methoden überlegen (13). Sie ist unabhängig vom Kontraktionszustand der Chromosomen und von der Ausbreitung ihrer Arme. Durch die Bestimmung der DNS wird ein direkter Bezug zum Träger der genetischen Information im Chromosom gewonnen.

Zur Bestimmung der DNS von Chromosomen sind verschiedene Methoden benutzt worden (2, 5, 7, 12, 20, 25, 26; Übersicht bei 13). Die Weiterentwicklung des fluorometrischen Verfahrens durch Nitsch (14), erfolgreich erprobt an den Chromosomen des Chinesischen Hamsters, liess den Versuch gerechtfertigt erscheinen, den DNS-Gehalt der Chromosomen des Menschen mit Hilfe des mikrofluorometrischen Verfahrens zu bestimmen. Dabei ermöglichte die Auflicht-Fluoreszenz-Anordnung des MPV (Mikroskop-Photometer mit variabler Messblende) (E. Leitz, Wetzlar) mit dem neuen

Fluoreszenz-Illuminator fluorometrische Messungen an Objekten der Mikrogrössenordnung der Chromosomen, da dieses System geringste Lichtmengen zu erfassen in der Lage ist.

Mit Pararosanilin steht uns ein DNS-spezifisches Fluorochrom zur Verfügung, dessen Herstellung standardisiert ist (8) und dessen Brauchbarkeit für cytochemische Untersuchungen der DNS sich wiederholt erwiesen hat.

Thema dieser Arbeit ist die Ausarbeitung und Anwendung einer von Nitsch et al. (14) beschriebenen Methode zur quantitativen fluorometrischen Bestimmung des DNS-Gehaltes der Chromosomen des weiblichen Karyotyps beim Menschen mit Hilfe des Fluorochroms Pararosanilin.

II. Literaturübersicht

Quantitative cytochemische DNS-Messungen an Chromosomen sind bisher von wenigen Autoren durchgeführt worden.

Carlson et al. (5) bestimmte den DNS-Gehalt der 22 Chromosomen des Chinesischen Hamsters mit Hilfe direkter Mikrospektrophotometrie nach Feulgen-Färbung.

Rudkin et al. (26, 27) bestimmte densitometrisch den DNS-Gehalt der Chromosomen von 5 menschlichen Metaphasen.

Radley (20) berichtete über absorptionscytophotometrische Feulgen-DNS-Messungen an animalischen Chromosomen.

Mendelsohn et al. (12) benutzte ein sog. CYDAC-System, ein Flying-Spot-Mikroskop in Verbindung mit einem Computer, das den Strahl einer Kathode zum Abtasten des Chromosoms verwendet.

Gaillard et al. (7) benutzte eine photographisch-photometrische Methode (photographic colorimetry) zur Messung des DNS-Gehaltes menschlicher Chromosomen.

Quantitative fluorometrische Messungen der Feulgen-DNS sind bisher nur von Nitsch et al. (14) an den Chromosomen des Chinesischen Hamsters und von Reiniger (21) an den Chromosomen des Mannes durchgeführt worden.

Berücksichtigt man alle Ergebnisse der vorliegenden Methoden zur Bestimmung des DNS-Gehaltes individueller Chromosomen, so zeigt sich trotz der Verschiedenheit der einzelnen Techniken eine gute Korrelation der Ergebnisse der einzelnen Autoren (Tab.2).

III. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Methodik der Chromosomenpräparation

Aus dem peripheren Blut wird eine Lymphocytenkultur angelegt und wie zur herkömmlichen Chromosomenanalyse vorbereitet. Die verwandte Methode beruht im wesentlichen auf der von Arakaki und Sparkes (1) angegebenen, wobei pro Kultur 0,2 ml Blut, durch Mikroentnahme an der Fingerbeere gewonnen, benötigt wird. Durch Zugabe von Phytohaemagglutinen (PHA) werden die Erythrocyten agglutiniert und anschließend abzentrifugiert. Weiterhin werden die Lymphocyten durch PHA zur Zellteilung stimuliert. Dazu muss das Material bei 37°C 68 Stunden inkubiert werden. Nach Zugabe von 0,03 mg Colcemid, einem Abkömmling des Spindelgiftes Colchicin, werden die Metaphasen arretiert und für weitere 3 Stunden inkubiert.

Nach insgesamt 71-stündiger Bebrütung wird der Bodensatz aufgeschüttelt und dann 5 Minuten bei 800 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird auf 0,5 ml abgesaugt und mit 1,5 ml auf 37°C erwärmtes Aq. dest. unter mehrmaligem Aufschütteln für 15 min. bei 37°C inkubiert. Danach wird bei 600 UpM 5 min zentrifugiert, bis auf 0,5 ml abgesaugt, der Unterstand mit 4 ml

Fixativ (Methanol-Eisessig 3:1) überschichtet und langsam vermischt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 800 UpM über 5 min und Absaugen auf 0,5 ml nochmals derselbe Fixationsvorgang. Danach bleibt der Ansatz bei Zimmertemperatur 20 Minuten oder länger stehen.

Dann wird bei 800 UpM für 5 min zentrifugiert und auf 0,5 bis 1 ml abgesaugt. Der Rest wird gut aufgerührt, auf völlig saubere, auf 4°C abgekühlte Objektträger aufgetropft und durch die Flamme getrocknet.

3.1.2. Kriterien der Mitoseauswahl

Die Präparate werden im Phasenkontrast durchgemustert; sie müssen völlig bakterienfrei sein.

Es werden nur vollständige Mitosen berücksichtigt. Dabei ist unbedingt erforderlich, daß die Chromosomen zueinander einen Abstand haben wenigstens von der Größe eines G - Chromosomes.

Die einzelnen Mitoseplatten müssen gut voneinander abgrenzbar sein. Geeignete Metaphasen werden photographiert und karyotypiert (Abb.1)

3.1.3. Färbung der Chromosomen

Die Präparate werden einer Feulgen-Färbung mit dem DNS-spezifischen Fluorochrom Pararosanilin in 0,05- und

0,01%-iger Konzentration unterzogen. Der Färbevorgang sei hier im einzelnen beschrieben (14):

1. Erneute Fixation in Formaldehyd-Methanol (1:9) für 3 min;
2. Waschen in Methanol für 20 sec;
3. Hydrolyse in 4n HCL bei 28°C für 105 min;
4. Stoppen der Hydrolyse in 1n HCL für 1 min;
5. Färben in 0,05% bzw. 0,01% Pararosanilin für 60 min;
6. Dreimal je 1 min in Bisulfit-Lösung spülen (5 ml 10%iges Natrium-Metabisulfit, 6 ml 1n HCL, 100 ml Aq. dest.)
7. 10 min in Leitungswasser waschen;
8. Je 2 min entwässern in 70%- und 90%-igem Alkohol und absolutem Alkohol-Xylol (1:1);
9. Dreimal je 5 min Xylol-Bad;
10. Eindecken mit Eukitt.

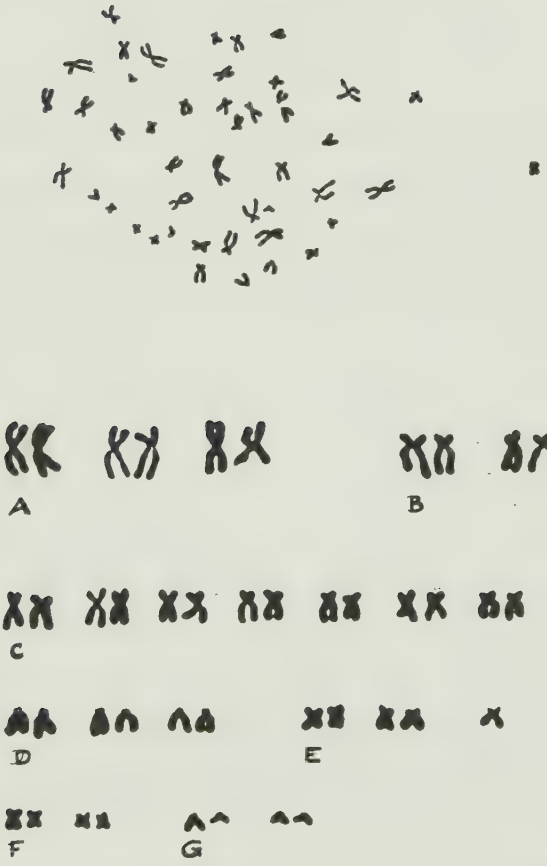


Abb.1 Phasenkontrast-Photographie einer Mitose eines ungefärbten und nicht eingedeckten Präparates bei 400-facher Vergrößerung mit zugehörigem Karyogramm

Um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurden sie im Dunkeln aufbewahrt.

Als Einbettungsmittel wurden ausser Eukitt (n = 1,491) (O. Kindler, Freiburg) fluoreszenzfreies Cargille-Öl (n = 1,556) (Cargille-Lab., Cedar-Grove, N.Y., USA), fluoreszenzfreies Immersionsöl (n = 1,515) (E. Leitz, Wetzlar) und dickflüssiges Paraffinöl geprüft. Es wurde festgestellt, dass ausser letzterem bei keinem der Einbettungsmittel eine Untergrundfluoreszenz messbar war. Der vorteilhafteren Handhabung wegen wurde Eukitt verwendet.

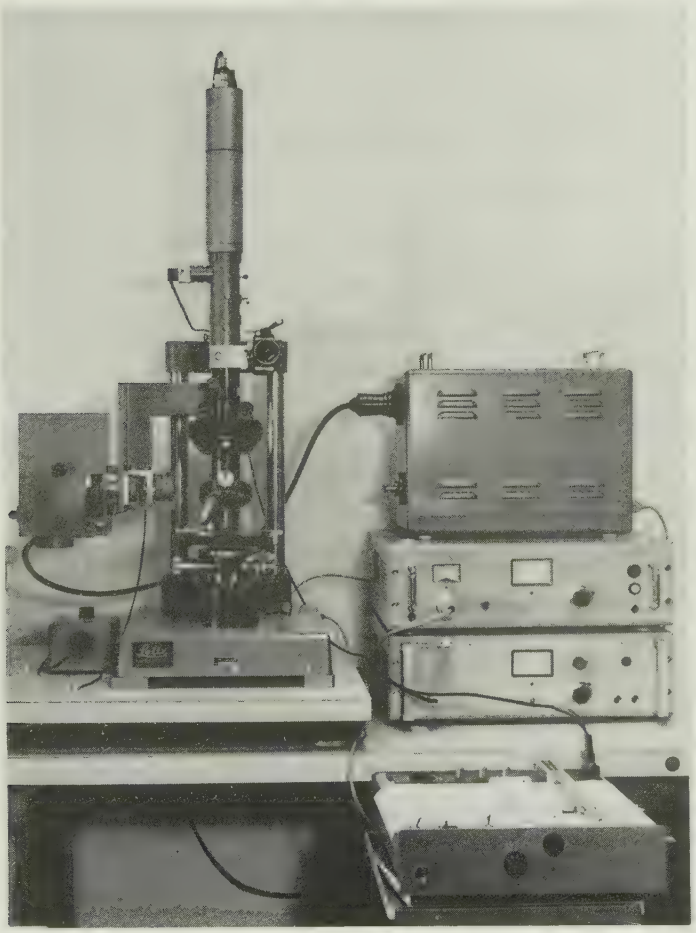


Abb.2 Ortholux-MPV (E. Leitz, Wetzlar) mit Beleuchtungseinrichtung und Photometer, Schreiber, Versorgungsgeräte für Lampe und Photovervielfacher (Spannungskonstanthalter nicht sichtbar).

3.2. Messinstrument und Messvorgang

3.2.1. Die Auflicht-Mikroskopie

Die Messungen wurden am MPV (Mikroskop-Photometer mit variabler Messblende) (E. Leitz, Wetzlar) (Abb.2) durchgeführt und zwar in einer Einrichtung für gleichzeitige und sukzessive Durchlicht-Phasenkontrast-Betrachtung und Auflicht-Fluoreszenz-Anregung (29, 31). Auflicht-Fluoreszenz-Anregung besitzt gegenüber der Anregung mit Durchlicht den Vorteil, daß die Erregerstrahlung nicht in den Beobachtungsstrahlengang gelangt und daß das Fluoreszenzlicht direkt in das Objektiv gelangt, welches somit gleichzeitig als Kondensor fungiert; dadurch ist die Strahlenführung des Fluoreszenzlichtes zwangsläufig zentriert.

Die auf das Präparat fokussierte Lichtmenge steigt folglich bei der Verwendung von Objektiven mit höherer numerischer Apertur exponential an und damit auch entsprechend die Fluoreszenz-Intensität. Ausserdem muss nur der Teil des Anregungslichtes ausgefiltert werden, der vom Präparat und vom Deckglas reflektiert wird.

Eine schematische Darstellung des Strahlenganges im MPV zeigt die Abb.3.

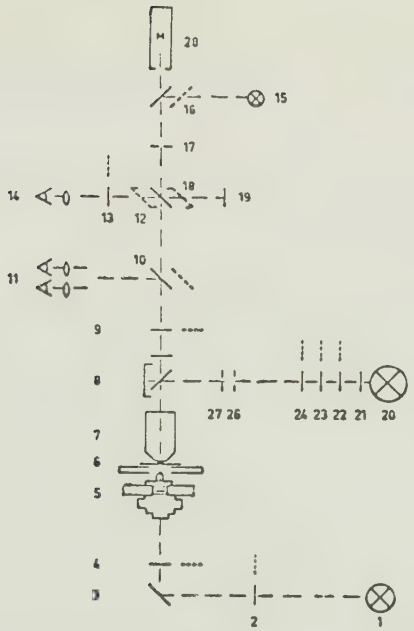


Abb.3 Schematische Darstellung des Strahlenganges im MPV:
1 Wolfram-Lampe
2 Filter OG 570
3 Spiegel
4 Verschluß
5 Phasenkontrast-Kondensor
6 Objekt
7 Objektiv
8 dichromatischer Spiegel mit eingebautem Sperrfilter und Lichtfalle
9 auswechselbares Sperrfilter
10 ausklappbares Umlenk-Prisma
11 binokularer Tubus
12 Spiegel, mit Teilerspiegel (18) auswechselbar
13 Verschluß
14 Photometereinblick
15 Meßblendenbeleuchtung
16 ausklappbarer Spiegel
17 Meßblende
18 halbdurchlässiger Teilerspiegel, mit Spiegel (12) auswechselbar
19 Tripel-Spiegel
20 Xenon-Lampe
21 Wärmeschutzfilter
22 Rot-Dämpfungsfilter BG 38
23 Anregungsfilter
24 Verschluß
26 Leuchtfeldblende
27 Streulichtblende
28 Photovervielfacher

3.2.2. Einstellung des Objektes

Um ein Ausbleichen des gefärbten Chromosomes (6 in Abb.3) zu verhindern, erfolgt seine Einstellung in der Phasenkontrast-Darstellung nach Zernike (33) unter Niedervolt-Beleuchtung (1 in Abb.3). Ein 2 mm OG 570 - Filter (Schott u. Gen., Mainz) beschränkt das Licht auf den roten Bereich, der auch vom Sperrfilter durchgelassen wird. Der Lichtstrahl geht durch den dichromatischen Teilerspiegel und das zugehörige, eingebaute Sperrfilter (8 in Abb.3), passiert das auswechselbare Sperrfilter (9 in Abb.3) und wird vom ausklappbaren Umlenkprisma (10 in Abb.3) in den binokularen Beobachtungs-Tubus (Periplan-Okular 10x) (11 in Abb.3) geleitet

Wird dieses Prisma ausgeklappt, geht der Strahl weiter zum halbdurchlässigen Teilerspiegel (12 in Abb.3) und wird zu 50% in den Photometer-Einblick (14 in Abb.3) reflektiert; die restlichen 50% werden durchgelassen, passieren die Messblende (17 in Abb.3) und treffen auf den Photovervielfacher (28 in Abb.3). Vor diesem dient ein ausklappbarer Spiegel (16 in Abb.3) der Beleuchtung der Messblende durch eine Niedervolt-Lampe (15 in Abb.3), sichtbar als helles Feld im Photometer-Einblick. Diese Anordnung ermöglicht die Angleichung der Messblende an das zu messende Objekt.

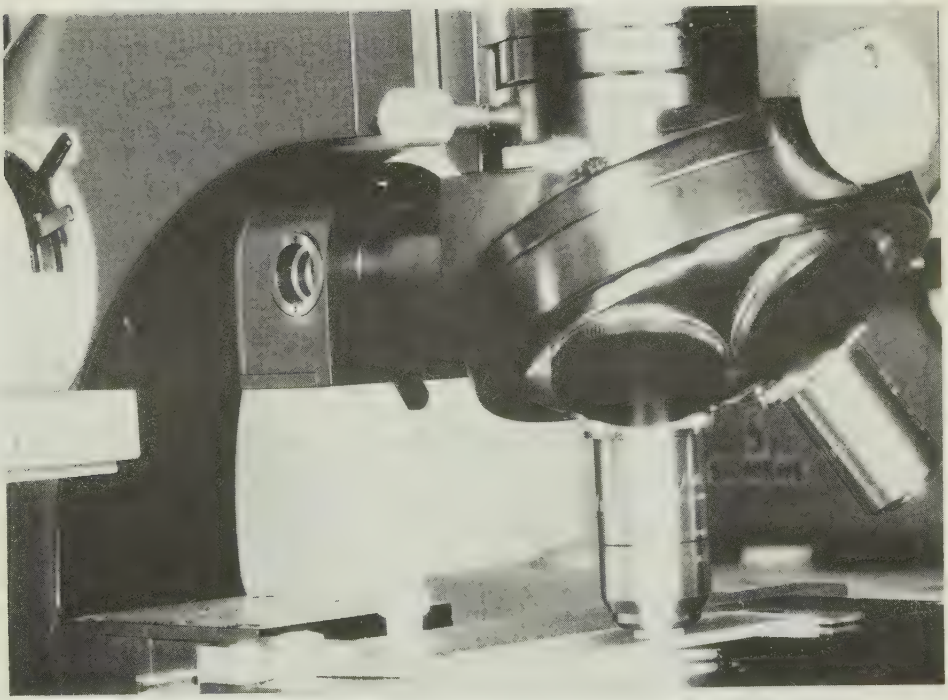


Abb.4 Fluoreszenz-Illuminator nach Ploem

3.2.3. Das Anregungslicht

Die Auflicht-Fluoreszenz-Anregung wurde ermöglicht durch den neuen Fluoreszenz-Opak-Illuminator nach Ploem (3, 10, 17, 18, 19), der mit 4 dichromatischen Teilerspiegeln ausgerüstet ist (Abb.4,5). Diese Spiegel zeigen bis zu einer definierten Kantenwellenlänge eine hohe Durchlässigkeit von ca. 90%. Jedem Spiegel ist ein eingebautes Sperrfilter zugeordnet, dessen Durchlässigkeit jeweils dort beginnt, wo die Reflektionsfähigkeit des Spiegels aufhört. Dieser Aufbau des Fluoreszenz-Illuminators bietet gegenüber einem herkömmlichen Illuminator eine Steigerung der Fluoreszenz-Intensität etwa um den Faktor 4.

Anregungs- und Fluoreszenz-Licht werden völlig voneinander getrennt; daraus resultiert der für die Mikrofluorometrie unabdingbare absolut dunkle Untergrund im Präparat.

Als Lichtquelle des anregenden Lichtes dient eine 150 W Xenon-Hochdruck-Lampe (Osram), die über einen Spannungs-Konstanthalter (E. Leitz, Wetzlar) betrieben wird. Zur Fluoreszenz-Messung wird die Phasenkontrast-Beleuchtung und die Meßblenden-Beleuchtung abgeschaltet, der Verschluß des Photometer-Einblickes (13 in Abb.3) geschlossen, der Spiegel zur Beleuchtung der Meßblende (16 in Abb.3) und das Umlenk-Prisma am Beobachtungs-Tubus (10 in Abb.3) ausgeklappt. Das Anregungs-Licht passiert nach

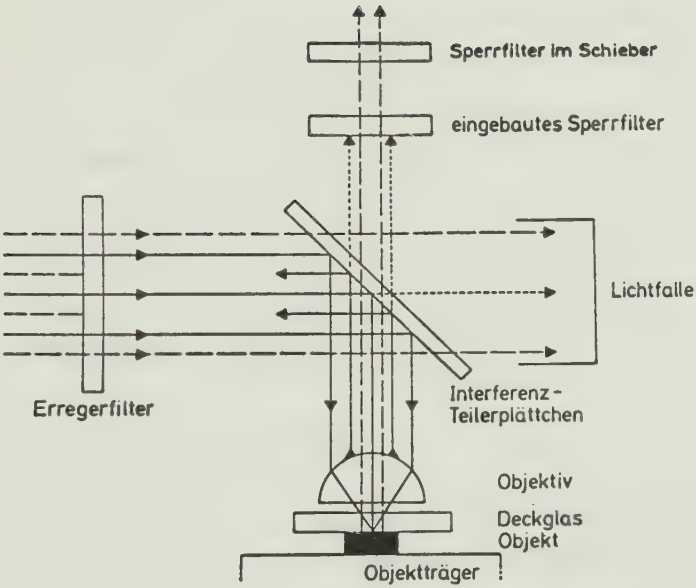


Abb.5 Schematische Darstellung des Strahlenganges im Fluoreszenz-Illuminator. Spiegelstellung 4 mit dem grün-reflektierenden Interferenz-Teilerplättchen. Durchgezogene Linie: Anregungslicht; waagerecht grobgestrichelt und feingestrichelt: absorbiertes Licht; senkrecht feingestrichelte Linie: im Sperrfilter zurückgehaltenes Licht; senkrecht grobgestrichelte Linie: Fluoreszenzlicht (nach Ploem, 1969).

Öffnen eines Verschlusses (24 in Abb.3) ein Wärmeschutz-Filter (21 in Abb.3), ein 5 mm - dickes Rot-Dämpfungs-Filter BG 38 (22 in Abb.3), das Interferenzlinien-Filter 549 nm (23 in Abb.3) (beide Schott u. Gen., Mainz) zur Ausfilterung des Erregerlichtes, die Leuchtfeldblende (26 in Abb.3), die Streulichtblende (27 in Abb.3) des Fluoreszenz-Illuminators, erreicht den dichromatischen Teilerspiegel mit der Kantenwellenlänge 580 nm (Position 4 am Fluoreszenz-Illuminator) (8 in Abb.3, Abb.5) und wird von dort durch das Objektiv (7 in Abb.3, Abb.5) auf das Feulgen - gefärbte Chromosom (6 in Abb.3, Abb.5) reflektiert.

3.2.4. Das Fluoreszenz-Licht

Das vom Chromosom emittierte Fluoreszenz-Licht passiert das Objektiv (Abb.5), wird vom dichromatischen Teilerspiegel vollständig durchgelassen, geht durch das eingebaute Sperrfilter K 580 und trifft auf das auswechselbare Sperrfilter RG 630 (Schott u. Gen., Mainz). Von der Gesamt-Fluoreszenz wird dadurch der Anteil von 580 nm bis 630 nm zurückgehalten; das restlicht Licht tritt zu 50% durch den halbdurchlässigen Teilerspiegel (18 in Abb.3) (50% werden zum Photometer-Einblick reflektiert), passiert die Messblende (17 in Abb.3) und erreicht schließlich den rotempfindlichen Photomultiplier (Typ 9558 A, S-20-Kathode, EMI, England) (28 in Abb.3), der seine Saugspannung aus dem hochstabilisierten Netzgerät NSHM BN 600 (Knott-Elek-

tronik, Hohenschäftlarn) bezieht. Die Messung des Photo-Stromes erfolgt mit dem Potentiometer-Linienschreiber Servogor RE 511 (Metrawatt, Nürnberg), der speziell auf die Kombination mit dem EMI - Photomultiplier abgestimmt ist (durch Knott-Elektronik, Hohenschäftlarn).

3.2.5. Angleichung der Blenden

Um eine den Messvorgang beeinträchtigende Streustrahlung nach Möglichkeit zu vermeiden, ist es notwendig, eine optimale Homogenität des anregenden und des emittierten Lichtes zu erreichen. Im Phasenkontrast wird zunächst die Meßblende über den Photometer-Einblick an das zu messende Chromosom angepaßt. Dann wird ein in genügendem Abstand zur Mitose liegender Zellkern in das Feld gefahren und zur Fluoreszenz gebracht. Dies ermöglicht die Anpassung der Leuchtfeldblende an Größe und Lage der Meßblende, wobei die Leuchtfeldblende um ca. 1 μ weiter geöffnet wird. Nach Unterbrechung des Anregungslichtes wird das Chromosom im Phasenkontrast erneut in die Meßblende eingestellt und fokussiert. Jetzt kann das Chromosom zur Fluoreszenz angeregt und die Intensität des Emissions-Lichtes gemessen werden.

Für große Chromosomen wird die Vierkantblende, für kleine Chromosomen die Irisblende verwendet (Abb.6).

Abb.6 Beispiele zur Lage von Mess- und Leuchtfeldblende bei verschiedenen Chromosomen.

Die Leuchtfeldblende wird um ca. 1 μ weiter offen gehalten.

3.2.6. Eichung der Photokathode

Die natürliche Drift der Photokathode erfordert eine regelmäßige Eichung während des Meßvorganges. Abweichungen werden mit Hilfe der Saugspannung an den jeweiligen Ausgangswert angeglichen. Als Fluoreszenzstandard wurde ein 2 mm - dickes GG 21 - Glas (Schott u. Gen., Mainz) (3) verwendet; es wird mit einem 5 mm - dicken BG 12 - Filter in Kombination mit einem 0,2 % - durchlässigen Graufilter zur Fluoreszenz angeregt. Dies ergibt eine grüne Fluoreszenz innerhalb des vom Objekt her geforderten Meßbereiches, die mit dem Sperrfilter K 530 ausgefiltert wurde. Zur Eichung wurde die Leuchtfeld- und die Meßblende (hierfür jeweils als zentrierbare Irisblende) ganz offen gehalten (30 µ bzw. 20 µ in der Objektebene). Bei dieser Blendenanordnung, einer Saugspannung von 1,1 kV und einer Eingangsempfindlichkeit des Schreibers von 50 mV lagen die gemessenen Eichwerte bei 35 %. Als Eichwert wurde der jeweils zu Beginn einer Messerie ermittelte Ausschlag genommen. Während einer Meßdauer von ca. 5 Stunden für alle 46 Chromosomen einer Metaphase wurde eine maximale Abweichung von $\pm$ 3 % festgestellt.

3.3. Ergebnis

3.3.1. Pararosanilin als Fluorochrom

Aus den in der Literatur als DNS-spezifische Fluorochrome beschriebenen Substanzen wurde Pararosanilin gewählt, da seine Herstellung standardisiert ist (8), Carlson et al. (5) dieselbe Feulgen-Färbung bei ihren absorptionscytophotometrischen DNS-Messungen benutzt hatten, die Stöchiometrie dieser Färbung erprobt ist (28) und selbst eine sehr geringe Farbstoff-Konzentration gute Fluoroszenz-Intensität ergibt.

Die Messungen wurden an mit 0,05%-igem und 0,01%-igem Pararosanilin gefärbten Präparaten durchgeführt. Die Konzentration konnte so niedrig gehalten werden, da der Farbstoff ohne Einfluss auf den Phasenkontrast ist. Allerdings bereitete der schwache Kontrast eingedeckter Präparate Schwierigkeiten beim Einstellen der Chromosomen. Unter den geprüften Einbettungsmitteln erwies sich auch hierfür Eukitt als das geeignetste.

3.3.2. Proportionalität zwischen Fluoroszenz-Intensität und Konzentration des Fluorochromes

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methodik ist eine lineare Proportionalität zwischen DNS-Gehalt und Fluoroszenz-Intensität des Objektes (15, 23, 24). Sie

ist nur bei geringen Farbstoff-Konzentrationen gegeben und besteht bis zu einem Wert von 0,2 Extinktionseinheiten (3) (Abb.7). Die Extinktion der 0,05%- und 0,01%-Feulgen-Pararosanilin - gefärbten chromosomalen DNS wurde bestimmt und liegt mit Werten unter 0,1 im linearen Bereich (14).

Die Abfallgeschwindigkeit der Fluoreszenz-Intensität ist zu Beginn der Anregungs-Beleuchtung am größten, jedoch für alle Chromosomen annähernd gleich (14). Der Maximalwert kann rechnerisch ermittelt werden, da der Schreiber für Vollausschlag 1 sec benötigt und die aufgezeichnete Kurve einen annähernd linearen Abfall aufweist. Der Messfehler durch Photo-Oxidation dürfte damit unter dem präparativen Fehler der Feulgen - Färbung liegen (3). Die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten von 5 verschiedenen Chromosomen zeigt die Abb.8.

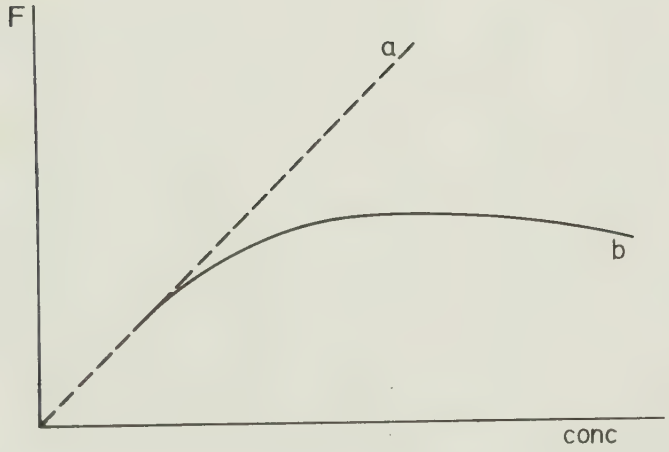


Abb.7 Fluoreszenzintensität (F) aufgetragen gegen die Konzentration des Fluorochroms (conc). Ein lineares Verhältnis (a) ist nur bei niedrigen Konzentrationen gegeben. Ab einem bestimmten Wert ist das Verhältnis gestört (b) (nach Perrin, 1924).

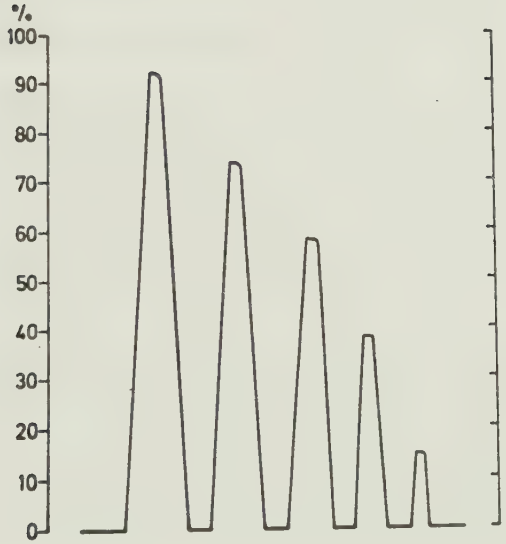


Abb.8 Meßwerte von 5 verschieden großen Chromosomen, gemessen mit einer Saugspannung von 1,1 KV bei einer Eingangsempfindlichkeit des Schreibers von 50 mV und einer Registriergeschwindigkeit von 600 mm/min. Für Vollausschlag (100 %) benötigt der Schreiber 1 sec.

3.3.3. Ausschließung subjektiver Fehlerquellen

Während der Durchmusterung der ungefärbten Präparate im Phasenkontrast wurden die ausgewählten Mitosen markiert und photographiert; dadurch wurde eine Doppelbelichtung sowohl der Mitosen als auch der einzelnen Chromosomen während des Messvorganges ausgeschlossen.

Es wurden nur solche Mitosen gewählt, bei denen alle Chromosomen möglichst gestreckt waren und somit die Blenden gut angeglichen werden konnten. Die größten verwendeten Meßblenden lagen für die Chromosomen der Gruppe A bei 12 x 4 µ.

Jedes Chromosom wurde nach der Messung daraufhin überprüft, ob es vollständig gemessen bzw. nicht zufällig ein in der Nähe liegendes Chromosom mitbelichtet wurde. Bei stichprobenartigen Messungen der Untergrund-Fluoreszenz im Bereich der verwendeten Meßblenden waren die Werte immer Null bzw. unter der Ablesegenauigkeit des Instrumentes. Eine Beeinflussung der Meßwerte wurde also durch die "absolute Dunkelheit" des Untergrundes ausgeschlossen. Sie erlaubt zwar eine beliebige Änderung der Größe der verwendeten Blenden, allerdings wird die Fluoreszenz-Intensität für ein und dasselbe Chromosom jedoch größer, wenn die angepaßte Meßblende bei unveränderter Größe der Leuchtfeld-Blende weiter geöffnet wird. Dies ist auf Streulicht-Effekte im Photometer zu-

rückzuführen.

Die regelmäßige Eichung der Photokathode während des Meßvorganges wurde schon beschrieben.

3.3.4. Meßergebnisse

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab.1 wiedergegeben. Der Meßwert für jedes Chromosom wurde aus der vom Schreiber aufgezeichneten Emissions-Kurve (Abb.8) graphisch durch den Punkt ermittelt, in dem sich die Senkrechte, errichtet auf dem Nullpunkt des Schreibers im Moment des Belichtungs-Beginnes, mit der Geraden schneidet, die den mittleren Abfall der Kurve repräsentiert. Aus dem Gesamtwert für die Metaphase wurden die prozentualen Anteile der Chromosomenpaare gewonnen. Da der absolute DNS-Gehalt der Leukozyten mit $2{,}7 \times 10^{-12}$ g angegeben ist, wurde der entsprechende Anteil der einzelnen Chromosomenpaare parallel aufgeführt (32).

		0,05 %	$gx10^{-14}$	0,01 %	$gx10^{-14}$
A	1	10,20	27,5	10,11	27,3
	2	9,52	25,7	9,63	26,0
	3	6,58	17,8	7,03	19,0
B	4	6,43	17,4	6,47	17,5
	5	5,71	15,4	5,82	15,7
C	6	5,55	15,0	5,56	15,0
	7	4,96	13,4	5,08	13,7
	8	4,53	12,2	4,71	12,7
	9	4,07	11,0	4,35	11,7
	10	3,84	10,4	4,01	10,8
	11	3,80	10,3	3,81	10,3
	12	3,53	9,5	3,52	9,5
X		5,84	15,8	4,72	12,7
D	13	3,44	9,3	3,47	9,4
	14	3,39	9,1	3,41	9,2
	15	3,35	9,0	3,31	8,9
E	16	2,91	7,9	3,10	8,4
	17	2,81	7,6	2,94	7,9
	18	2,44	6,6	2,39	6,5
F	19	2,35	6,4	1,90	5,1
	20	1,72	4,6	1,65	4,5
G	21	1,63	4,4	1,57	4,2
	22	1,40	3,8	1,44	3,9
		100,00		100,00	

Tabelle 1 Die relativen Werte der einzelnen Chromosomenpaare bei Färbung mit 0,05%-igem und 0,01%-igem Pararosanilin. Jeweils parallel dazu ist aufgeführt das absolute DNS-Gewicht.

IV. Diskussion

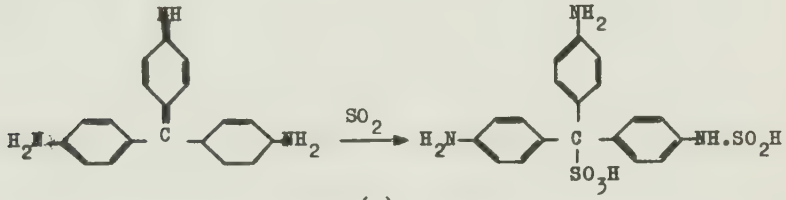
4.1. Die Feulgen - Reaktion

Für cytophotometrische Untersuchungen der DNS wird am häufigsten die Feulgen'sche Kern-Reaktion benützt (6). Sie ist abhängig von der primären Säure-Hydrolyse mit bevorzugter Abspaltung der Purine; dadurch wird die Aldehyd-Funktion der Desoxy-Ribose freigelegt, an die die Purine gebunden waren. Diese Aldehyde können nun mit einem entfärbten Schiff'schen Reagenz reagieren, das in die gefärbte Form übergeführt und ohne zu diffundieren in situ an die DNS gebunden wird. Den Beweis, daß die Aldehyd-Funktion für eine positive Reaktion notwendig ist, liefert die Tatsache, daß aldehydaffine Reagenzien die Feulgen-Reaktion blockieren, wenn sie nach der Säure-Hydrolyse zugegeben werden.

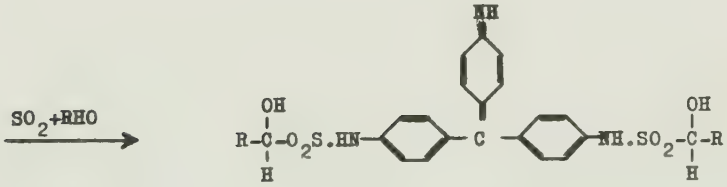
Die Spezifität der Feulgen-Reaktion steht außer Zweifel. Sie ist negativ nach vollständiger Entfernung der DNS entweder enzymatisch oder durch Behandlung mit Trichlor-Essigsäure. RNS und Protein geben keine Feulgen-Reaktion und Vorbehandlung mit Ribonuklease zeigt keinen Einfluß auf die Feulgen-Intensität.

Der Reaktionspartner der DNS, das Fluorochrom Pararosanilin wird als Schiff'sches Reagenz eingesetzt, erhalten durch Zugabe von Schwefliger Säure zu Pararosanilin, wo-

durch eine Amino-Sulfonsäure des Pararosanilin (I) entsteht. Nach Zugabe von zwei Aldehyd-Gruppen zu diesem farblosen Pararosanilin-Derivat (- Molekül) wird die Sulfonsäure-Gruppe vom zentralen Kohlenstoff-Atom abgespalten und das Molekül in die magenta-gefärbte quinoide Form (II) übergeführt.



(I)



(II)

Ob ein Verlust von DNS während der Fixierung (Methanol-Eisessig) durch Eisessig-Einwirkung (7), hypotone Behandlung (23) oder Hydrolyse bei Feulgen-Färbung (7) auftritt, läßt sich nicht mit Bestimmtheit feststellen; die Meinungen der verschiedenen Autoren darüber gehen weit auseinander. Jedenfalls ist bei Standardisierung der Bedingungen von Präparation, Fixierung, Fluorochrom-Herstellung, Hydrolyse und Färbe-Vorgang die Feulgen-Färbung quantitativ sehr zuverlässig (28).

4.4. Der Meßvorgang

Von entscheidender Bedeutung während des Meßvorganges ist die Angleichung der Blenden an das Objekt bzw. aneinander. Da ein Chromosom eine größere Fluoroszenz-Intensität aufweist, wenn die Meßblende bei unveränderter Größe der Leuchtfeld-Blende weiter geöffnet wird, verursacht durch Streulicht-Effekte im Photometer, muß die Angleichung der Blenden exakt erfolgen. Dies bereitet gelegentlich Schwierigkeiten, da eingedeckte Präparate einen schwachen Phasenkontrast liefern; da die Meßblende aber durch den Photometer-Einblick angeglichen wird, durch den ohnehin nur 50 % des ursprünglichen Lichtes austreten, ist die Lichtstärke und damit der Kontrast nochmals um die Hälfte verringert. Da außerdem eine Meßdauer von ca. 5 Stunden für eine Metaphase im abgedunkelten Raum eine starke Beanspruchung für das Auge darstellt, wäre eine automatische Vor-

richtung zur Registrierung und Auswertung des Fluoreszenz-Lichtes von großem Vorteil zur Ausschließung von subjektiven Fehlerquellen.

4.5. Reabsorption

Reabsorptionsphänomene (3) spielen bei den Untersuchungen keine Rolle, da das verwendete auswechselbare Sperrfilter RG 630 (Schott u. Gen., Mainz), das gleichzeitig zur visuellen Kontrolle des gemessenen Objektes benützt werden kann, außerhalb des spektralen Absorptionsbereiches des Pararosanilins liegt.

4.6. Bisherige fluorometrische DNS-Messungen

Quantitative fluorometrische DNS-Messungen sind bisher von Bosshard (4), Rigler (22) und von Böhm und Sprenger (3) an Zellkernen, von Nitsch et al. (14) an den Chromosomen des Chinesischen Hamsters und von Reiniger (21) an den Cromosomen des Mannes versucht worden.

Bosshard (4) benutzte Auramin O und Berberinsulfat in 50%iger alkoholischer Lösung bzw. in Puffer mit pH 6,3.

Rigler (22) versuchte mit Hilfe des Zeisschen UMSP I eine Analyse des Emissions-Spektrums von mit Acridin-Orange gefärbten DNS- und RNS-Gruppen. Für quantitative Bestimmung des nukleären DNS-Gehaltes sind aber komplizierte Berechnungen nötig.

Böhm und Sprenger (3) untersuchten den DNS-Gehalt von Meerschweinchen-Spermien, Mäuse-Lymphocyten, Granulocyten und Leber-Zellkernen unter Verwendung von Acridin-Orange, Coriphosphin O und Pararosanilin und erreichen eine gute Korrelation zu den DNS-Werten, die absorptionscytophotometrisch von denselben Objekten gewonnen wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Nitsch et al. an den Chromosomen des Chinesischen Hamsters korrelieren ebenfalls gut mit den DNS-Werten anderer Autoren an den entsprechenden Objekten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß fluorometrische DNS-Messungen verläßliche und reproduzierbare Werte liefern.

4.7. Prüfung der eigenen Ergebnisse

Die Chromosomen des Menschen wurden schon von anderen Arbeitsgruppen untersucht.

Rudkin et al. (25, 26, 27) massen die Absorption von Chromosomen mit einem Densitometer.

Pfeiffer (16) bestimmte die Länge der einzelnen Chromosomen des menschlichen Karyotypes.

Lampert (11) versuchte durch Bestimmung des Trockengewichtes menschlicher Chromosomen eine quantitative Aussage des DNS-Gehaltes.

Alle Ergebnisse korrelieren gut miteinander; sie sind deshalb in Tab.2 mit den eigenen Ergebnissen (Spalte 1) nebeneinander zum Vergleich aufgeführt.

Die hier vorgelegten Ergebnisse stellen relative Werte dar; absolute Werte lassen sich mit dieser Methode bei der Benutzung eines Bezugssystems (Zellkern oder Chromosom mit bekannten DNS-Gehalt oder DNS-Folien) (4, 30) gewinnen.

		Feulgen-Fluoreszenz Pararosanilin		Rudkin (1965)	Pfeiffer (1968)	Lampert (1969)
		0,05 %	0,01 %	Absorptions-messung	Längen-messung	Trocken-gewicht
A	1	10,20	10,30	8,38	8,15	9,81
	2	9,52	10,00	7,47	7,64	7,43
	3	6,58	7,81	6,63	6,73	6,76
B	4-5	6,08	6,48	5,80	6,05	4,50
C	6-X-12	4,52	4,05	4,89	4,76	4,86
D	13-15	3,38	3,48	3,57	3,38	3,74
E	16	2,91	3,30	2,78	3,14	3,59
	17-18	2,56	2,85	2,88	2,85	2,74
F	19-20	2,08	1,77	2,23	2,38	2,14
G	21-22	1,52	1,60	1,64	1,77	1,54

Tabelle 2 Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden. Die Werte für die einzelnen Chromosomenpaare sind relativ.

4.8. Genauigkeit der mikrofluorometrischen DNS-Messung

Ein genaues Urteil darüber besteht nicht, da sie von verschiedenen, nicht meßbaren Faktoren abhängig ist (23). Die Meßfehler, die durch die Apparatur bedingt sind, sind geringer als die Fehler, die durch das Objekt selbst verursacht werden. Folgende Faktoren sind entscheidend: Methodik der Präparation; Spezifität, Linearität und Stabilität der Färbung; Primär-Fluoreszenz des Objektes. Bis jetzt steht kein Vergleichsobjekt mit genau bekanntem, konstantem DNS-Gehalt zur Verfügung, so daß eine Prüfung der Genauigkeit nur durch Vergleich mit den Ergebnissen anderer Methoden möglich ist. Da diese Methoden jedoch ebenfalls mit Fehlern behaftet sind, kann die Meßgenauigkeit nur relativ bestimmt werden.

Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß die Ergebnisse der Mikrofluorometrie gut mit den Vergleichswerten korrelieren. Quantitative mikrofluorometrische DNS-Messungen von menschlichen Chromosomen haben sich damit als genauso zuverlässig und reproduzierbar erwiesen wie andere Methoden.

V. Zusammenfassung

Quantitative fluorometrische DNS-Messungen am weiblichen Chromosomensatz des Menschen sind bisher nicht durchgeführt worden. In der vorliegenden Arbeit wird die Ausarbeitung und Anwendung einer Methode nach Nitsch (14) beschrieben, bei der ein mikrofluorometrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des DNS-Gehaltes individueller Chromosomen verwendet wird. Als Meßapparatur dient das MPV (Mikroskop-Photometer mit variabler Meßblende, E. Leitz, Wetzlar), ausgestattet mit einer Vorrichtung für gleichzeitige und sukzessive Durchlicht-Phasenkontrast-Beleuchtung und Auflicht-Fluoreszenz-Anregung unter Verwendung des neuen Fluoreszenz-Opak-Illuminators. Die Meß-Apparatur wurde eigens den speziellen Erfordernissen der Mikrofluorometrie an Chromosomen angepaßt.

Gefärbt wurden die Chromosomen mit der herkömmlichen Feulgen-Färbung, von der erst seit 1967 bekannt ist, daß sie nach Anregung mit grünem Licht der Wellenlänge 549 nm im Auflicht eine starke rote Fluoreszenz ergibt; die Färbung wurde in Vorversuchen für Chromosomen standardisiert: 105 min in 4 n HCl bei 28°C Hydrolyse, Färbung 60 min in 0,01%igem bzw. 0,05%igem Pararosanilin.

Zum Vergleich liegen die Ergebnisse von Absorptionsmessungen, Längenmessungen und Bestimmung des Chromosomen-Trockengewichtes vor.

Die Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation mit den Vergleichswerten von Untersuchungen an menschlichen Chromosomen, sie sind gut reproduzierbar.

Diese Methode ist eine neue Variante zur Bestimmung des DNS-Gehaltes von individuellen menschlichen Chromosomen und zu ihrer Identifizierung innerhalb des Karyotyps.

VI. Literaturverzeichnis

1. Arakaki, D.T., Sparkes, R.S.: Microtechnique for culturing leucocytes from whole blood Cytogenetics 2, 57 (1963)

2. Bailly, S.: Etude cytophotométrique de lat teneur acides nucléiques des chromosomes métaphasiques de l'amphibien urdèle Pleurodèles waltlii michah. Exp. Cell. Res. 48, 549-556 (1967)

3. Böhm, N., Sprenger, E.: Fluorescence Cytophotometry: A valuable Method fpr the quantitative Determination of nuclear Feulgen-DNA. Histochemie 16. 100-118 (1968)

4. Bosshard, U.: Fluoreszenzmikroskopische Messungen des DNS-Gehaltes von Zellkernen. Z. Wiss. Mikr. 65, 391-408 (1964)

5. Carlson, L., T Caspersson, G.E. Foley, J. Kudynowski, G. Lommaka, E. sommonsson, L. Sören: The Application of quantitative cytochemical techniques to the study of individual mammalian Chromosomes. Exp. Cell. Res. 31, 589-594 (1963)

6. Deitch, A.D.: Cytophotometry of Nucleic Acids. In: Introduction to Quantitative Cytochemistry (G. Wied, ed.) New York and London: Academic Press(1966)

7. Gaillard, J.L.J., P. van Duijn, A. Schaberg: Photometric Determination of DNA in human Cromosomes. Exp. Cell. Res. 53, 417-431 (1968)

8. Graumann, W.: Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. Z.Wiss. Mikr. 61, 225-226 (1953)

9. Grehn, J., H. Kornmann: Kontrastfluoreszenz mit Opak-Illuminator. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 3, 108-111 (1965)

10. Kraft, W.: Die Technologie des Leitz-Fluoreszenz-Opak. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 4, 239-242 (1969)

11. Lampert, F.: Feinstruktur und Trockengewicht menschlicher Chromosomen, Quantitative Elektronenmikroskopie. Naturw. 56, 629-633 (1969)

12. Mendelsohn, M.L., T.J. Conway, D.A. Hungerford, W.A. Kolmann, B.H. Perry, J.M.S. Prewitt: Computer-oriented Analysis of human Chromosomes. I. Photometric Estimation of DNA-Content. Cytogenetics 5, 223-242 (1964)

13. Nitsch, B., J.-D. Murken: Probleme der Charakterisierung einzelner Chromosomen durch DNS-Messungen Humangenetik 9, 16-19 (1970)

14. Nitsch, B., J.-D. Murken, H.-J. Brück: Determining Feulgen-DNA of Individual Chromosomes by Cytophotometry with Incident Light. Histochemie 23, 254-265 (1970)

15. Perrin, F.: Loi de décroissance du pouvoir fluorescent de la concentration. C. R. Acad. Sci. (Paris) 178, 1978-1980 (1924)

16. Pfeiffer, R.A.: Karyotyp und Phänotyp der autosomalen Chromosomenaberration beim Menschen. Stuttgart, Fischer (1968)

17. Ploem, J.S.: Die Möglichkeit der Auflichtfluoreszenzmethoden bei Untersuchungen von Zellen in Durchströmungskammern und Leightonröhren. In: Immunhistochemie, Verh. Ges. Histochem. 10. Sympos. 1965 (H. v. Mayersbach ed.) Acta histochem. (Jena) 7, 339-343 (1967)

18. - The Use of a vertical Illuminator with interchangeable dichrotic mirrors for Fluorescense Microscopy with Incident Light. Z. wiss. Mikr. 68, 129-142 (1967)

19. - Ein neuer Illuminator-Typ für die Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 4, 225-238 (1969)

20. Radley, J.M.: DNA Content of Individual Chromosomes of Protemnodon Bicolor. Exper. Cell. Res. 41, 217-220 (1965)

21. Reiniger, H.: Bestimmung des DNS-Gehaltes der einzelnen Chromosomen des männlichen Karyotyps beim Menschen durch Fluoreszenz-Cytophotometrie.
Dissertation München (1972)

22. Rigler, R., Jr.: Microfluorometric Characterization of Intracellular Nucleics and Nucleoproteins by Acridine Orange.
Acta physiol. scand. 67, Suppl. 267, 1-122 (1966)

23. Ruch, F.: Determination of DNA Content by Microfluorometry. In: Introduction to Quantitative Cytochemistry (G. Wied, ed.) 281-294. New York ans London: Academic Press 1966

24. Ruch, F., U. Bosshard: Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenz-Mikroskop.
Z. wiss. Mikr. 65, 335-341 (1963)

25. Rudkin, G.T., J. Schulz: (Abstr.) Genetics 46, 893-894 (1961)

26. -, Hungerford D.A., Nowell P.C.: DNA Content of Chromosome PH and Chromosome 21 in Humanic Chronic Granulocytic Leukaemia.
Science 144, 1229-1232 (1964)

27. Rudkin, G.T.: Photometric Measurements of Individual Metaphase Chromosomes.
In Vitro 1, 12-20 (1965)

28. Sandritter, W., M. Carl, W. Ritter: Cytophotometric Measurements of the DNA Content of Human Malignant Tumors by Means of the Feulgen Reaktion.
Acta cytol. (Philad.) 10, 26-30 (1966)

29. Thaer, A.A.: Instrumentation for Microfluorometry. In: Introduction to Quantitative Cytochemistry (G. Wied, ed.) 427-435. New York and London: Academic Press 1966

30. Van Duijn, P., J.-P. Persijn: A new Technique for Studying the Quantitative Aspects of cytochemical Reactions and its Application to the Feulgen Reaction.
Nature 186, 805-806 (1960)

31. Weber, K.: Leitz-Mikroskop-Photometer MPV mit variabler Meßblende. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 3, 103-107 (1965)

32. White, D.: The Chromosomes. Wiley and Sons Inc. (New York) (1961)

33. Zernike, F.: Phasecontrast, a New Method for Microscopic Observation of Transparent Objects. Physika 9, 686-974 (1942)

Dem Leiter der genetischen Abteilung der Kinderpoliklinik, Herrn Priv.Doz. Dr. J.-D. Murken danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen sowie für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Spiess danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. B. Nitsch und Herrn H.-J. Brück danke ich für bereitwillige Unterstützung bei der Abwicklung technischer Probleme.

Fräulein R. Frankenberger danke ich für die technische Assistenz und für viele hilfreiche Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. W. Stich, Herrn Priv.Doz. Dr. M. Bauchinger sowie Herrn Dr. F. Back danke ich für die Erlaubnis zur Benützung des MPV im Institut für Hämatologie der GSF.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (AZ Mu 258/3) danke ich zur Ermöglichung der Teilnahme an der 12. Tagung der Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik in Göttingen und am XIII. Internationalen Kongreß für Pädiatrie in Wien.

Lebenslauf

Geboren am 6. Juni 1946 als 2. Sohn der Beamtenseheleute Josef und Franziska Greipl in Piflas b. Landshut;

Besuch von Volksschule und Oberrealschule in Landshut mit Abitur 1965;

Beginn des Studiums der Naturwissenschaften an der Universität München 1965, 1966 Wechsel zum Fach Humanmedizin, 1967 Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung;

seit 1968 verheiratet und Vater einer Tochter;

ärztliche Vorprüfung 1969 abgelegt, Staatsexamen im Herbst 1972.

Accord Blitz
München 2 Telefon 775218
Lindwurmstraße 60/0 Ghs.